

肉桂酸-4-羟化酶 (Cinnamic acid-4-hydroxylase, C4H)试剂盒说明书

微量法 50 管/48 样

正式测定前务必取 2-3 个预期差异较大的样本做预测定

测定意义:

C4H 又称反式肉桂酸-4-单氧化酶, 多存在于高等植物、酵母、菌类中, 该酶催化肉桂酸羟化作用产生 4-香豆酸盐, 是苯丙烷途径中继 L-苯丙氨酸解氨酶之后的第二个关键酶。

测定原理:

C4H 催化肉桂酸和 NADP 生成 4-香豆酸盐和 NADPH, 在 340nm 下测定 NADPH 生成速率, 即可反映 C4H 活性。

需自备的仪器和用品:

紫外分光光度计、台式离心机、可调式移液器、1mL 石英比色皿、研钵、冰和蒸馏水。

试剂的组成和配制:

提取液: 100mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂一: 液体 60 mL×1 瓶, 4℃ 保存;

试剂二: 粉剂×2 瓶, -20℃ 保存;

粗酶液提取:

细菌或培养细胞: 先收集细菌或细胞到离心管内, 离心后弃上清; 按照细菌或细胞数量 (10^4 个): 提取液体积 (mL) 为 500~1000: 1 的比例 (建议 500 万细菌或细胞加入 1mL 提取液), 超声波破碎细菌或细胞 (冰浴, 功率 20% 或 200W, 超声 3s, 间隔 10s, 重复 30 次); 8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

组织: 按照组织质量 (g): 提取液体积 (mL) 为 1: 5~10 的比例 (建议称取约 0.1g 组织, 加入 1mL 提取液), 进行冰浴匀浆。8000g 4℃ 离心 10min, 取上清, 置冰上待测。

测定步骤:

1、分光光度计或酶标仪预热 30min 以上, 调节波长至 340nm, 蒸馏水调零。

2、样本测定

(1) 取试剂二一瓶, 加入 25mL 试剂一充分溶解混匀, 置于 37℃ (哺乳动物) 或 25℃ (其它物种) 水浴 5min; 现配现用 (配好后 24h 内用完);

(2) 在 1mL 石英比色皿中加入 50 μ L 样本和 950 μ L 试剂二, 混匀, 立即记录 340nm 处初始吸光值 A1 和 5min 后的吸光值 A2, 计算 $\Delta A = A2 - A1$ 。

C4H 活性计算：

(1) 按样本蛋白浓度计算：

单位的定义：每 mg 组织蛋白每分钟产生 1 nmol 的 NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{C4H (nmol/min/mg prot)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (V_{\text{样}} \times C_{\text{pr}}) \div T = 643 \times \Delta A \div C_{\text{pr}}$$

(2) 按样本鲜重计算：

单位的定义：每 g 组织每分钟产生 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{C4H (nmol/min/g 鲜重)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (W \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 643 \times \Delta A \div W$$

(3) 按细菌或细胞密度计算：

单位的定义：每 1 万个细菌或细胞每分钟产生 1 nmol NADPH 定义为一个酶活力单位。

$$\text{C4H (nmol/min/10}^4 \text{ cell)} = [\Delta A \times V_{\text{反总}} \div (\epsilon \times d) \times 10^9] \div (500 \times V_{\text{样}} \div V_{\text{样总}}) \div T = 1.286 \times \Delta A$$

V 反总：反应体系总体积， 1×10^{-3} L； ϵ ：NADPH 摩尔消光系数， 6.22×10^3 L / mol / cm；d：比色皿光径，1cm；V 样：加入样本体积，0.05 mL；V 样总：加入提取液体积，1 mL；T：反应时间，5 min；Cpr：样本蛋白质浓度，mg/mL；W：样本质量，g；500：细菌或细胞总数，500 万。